

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки: 06.03.01 – Биология
Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В
ОТНОШЕНИИ ОРАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ

Студент 4 курса
группы 01-904
"13" *мая* 2023 г.

Аитова Аитова Д. Ф.

Научный руководитель
к.б.н., доцент,
"13" *мая* 2023 г.

Харитонов Харитонов М.А.

Заведующий кафедрой
микробиологии
д.б.н., профессор,
"13" *мая* 2023 г.

Ильинская Ильинская О.Н.

Казань – 2023

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Микробная биоплёнка как форма существования бактерий в организме человека	7
1.2. Микрофлора ротовой полости	14
1.3. Представители родов <i>Rothia</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Streptococcus</i>	16
1.4. Нанобиотики: потенциал наноразмерных материалов и технологий в современных условиях роста резистентности микроорганизмов к антибиотикам	23
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	24
2.1 Штаммы	24
2.2 Наночастицы серебра	24
2.3 Культивирование бактерий и питательные среды	25
2.4 Диско диффузионный метод (ДДМ) определения чувствительности микроорганизмов к антибиотическим препаратам	25
2.5 Определение способности бактерий образовывать биоплёнки	26
2.6 Определение способности бактерий к автоагрегации и коагрегации	26
2.7 Определение минимальной подавляющей и минимальной бактерицидной концентраций	28
2.8 Метод определения жизнеспособности бактериальных клеток – редуктазная проба с резазурином	28
2.9 Капельно-чашечный метод определения количества микроорганизмов (Drop Plate анализ)	29
2.10 Выявление живых и мертвых клеток бактерий	29
2.11 Детекция внутриклеточного уровня активных форм кислорода	30
2.12 Статистическая обработка результатов	31
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	32
3.1 Морфология колоний и клеток <i>Neisseria mucosa</i> S1, <i>Rothia</i>	

<i>dentocariosa</i> S2, <i>Streptococcus sobrinus</i> A1	
3.2. Характеристика антибиотикорезистентности штаммов <i>Neisseria mucosa</i> S1, <i>Rothia dentocariosa</i> S2, <i>Streptococcus sobrinus</i> A1	38
3.3 Автоагрегационная и коагрегационная способность штаммов <i>N.mucosa</i> S1, <i>R. dentocariosa</i> S2, <i>S. sobrinus</i> A1.	44
3.4. Влияние наночастиц серебра на рост штаммов <i>Neisseria mucosa</i> S1, <i>Rothia dentocariosa</i> S2, <i>Streptococcus sobrinus</i> A1	46
3.5. Определение способности бактерий <i>Neisseria mucosa</i> S1, <i>Rothia dentocariosa</i> S2, <i>Streptococcus sobrinus</i> A1 образовывать биопленки при воздействии наночастиц AG/PVP	49
3.6 Влияние наночастиц серебра на биопленки, сформированные <i>Neisseria mucosa</i> S1, <i>Rothia dentocariosa</i> S2, <i>Streptococcus sobrinus</i> A1	52
3.7. Детекция внутриклеточного уровня активных форм кислорода при воздействии наночастиц AG/PVP на совместную культуру <i>N. mucosa</i> S1, <i>R. dentocariosa</i> S2, <i>S. sobrinus</i> A1	56
ВЫВОДЫ	58
ЛИТЕРАТУРА	60

ВВЕДЕНИЕ

Здоровье полости рта является одним из основных показателей общего здоровья, благополучия и качества жизни. Несмотря на высокие достижения в области гигиены полости рта, такие опосредованные полимикробными биопленками заболевания как кариес зубов, гингивит, пародонтит, протезный стоматит продолжают представлять угрозу здоровью населения. Это особые случаи инфекционных заболеваний, при которых источником инфекции являются не экзогенные микроорганизмы, а представители оральной микробиоты [Rumbaugh *et al.*, 2014]. Кроме того, оральные бактерии могут вызывать системные заболевания, в том числе заболевания желудочно-кишечного тракта и сердечно-сосудистой системы [Hu *et al.*, 2019]. Воспалительные заболевания десен, микротравмы способствуют проникновению бактерий в кровеносные сосуды и последующему распространению по всему организму.

В ряду средств профилактики и терапии инфекционных заболеваний, ассоциированных с микробной колонизацией поверхностей ротовой полости, важное место занимают антисептические препараты и антибиотики. Однако, в связи с особенностями структурно-функциональной организации биоплёнок, для уничтожения бактерий в их составе требуются концентрации антибиотических препаратов в $10^2 - 10^3$ раз превышающие их минимальные ингибирующие концентрации в отношении планктонных форм [Gilbert *et al.*, 1997]. При этом биопленки, состоящие из разных видов микробов, являются еще более стабильными, чем моновидовые биопленки [Fan *et al.*, 2021]. Использование антисептиков и антибиотиков зачастую сопряжено с появлением нежелательных побочных эффектов (токсическое действие, аллергические реакции). Но что особенно нежелательно, частое их применение ведет к возникновению резистентности к терапии и распространению генов устойчивости к антибиотикам [FDA Drug Safety Communication, 2017].

Таким образом, они могут внести негативный вклад в глобальную проблему роста числа бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (multidrug-resistant, MDR), которая напрямую связана с усугубляется недостатком новых антибиотиков. В настоящее время гены резистентности к антибиотикам рассматриваются как самостоятельный вид поллигентов окружающей среды [Ire, *et al.*, 2020].

Цель: охарактеризовать антибактериальное действие наночастиц серебра стабилизированных поливинилпирролидоном (AG/PVP), в отношении, оральных изолятов бактерий *N. mucosa* S1, *R. dentocariosa* S2, *S. sobrinus* A1.

Задачи:

1. Охарактеризовать морфологию колоний и клеток *N. mucosa* S1, *R. dentocariosa* S2, *S. sobrinus* A1.
2. Охарактеризовать резистентность *N. mucosa* S1, *R. dentocariosa* S2, *S. sobrinus* A1 к противомикробным препаратам.
3. Оценить автоагрегационную и коагрегационную способность штаммов *N. mucosa* S1, *R. dentocariosa* S2, *S. sobrinus* A1.
4. Исследовать влияние наночастиц серебра на рост *N. mucosa* S1, *R. dentocariosa* S2, *S. sobrinus* A1 и определить минимальные ингибирующие и минимальные бактерицидные концентрации.
5. Охарактеризовать воздействие наночастиц AG/PVP на процесс формирования биопленок штаммами *N. mucosa* S1, *R. dentocariosa* S2, *S. sobrinus* A1, а также совместной культурой.
6. Охарактеризовать воздействие наночастиц AG/PVP на зрелые биопленки, образованные штаммами *N. mucosa* S1, *R. dentocariosa* S2, *S. sobrinus* A1, а также совместной культурой.
7. Установить внутриклеточный уровень образования активных форм кислорода (АФК) под воздействием наночастиц AG/PVP на совместную культуру *N. mucosa* S1, *R. dentocariosa* S2, *S. sobrinus* A1.

ВЫВОДЫ

1. *N. mucosa* S1 – грам-отрицательные кокки и дипококки, образующие желто-бежевые слизистые колонии округлой формы. *R. dentocariosa* S2 – грамположительные, варьирующие от коккоидных до дифтероидных и нитевидных форм бактерии. Колонии молочно-белые, матовые, с ровными краями. *S. sobrinus* A1 – грамположительные стрептококки, колонии белые, округлые, глянцевые, выпуклые, с ровными краями, на кровяном агаре образуют зону α -гемолиза.

2. *S. sobrinus* A1 является резистентным к 11 из 20 проанализированных антибиотических препаратов. Менее устойчивы *N. mucosa* S1 (8 из 20) и *R. dentocariosa* S2 (3 из 20).

3. Способностью к аутоагрегации *N. mucosa* S1, *R. dentocariosa* S2 выше (более 86%), чем у *S. sobrinus* A1 (74,1%). Смешанная культура *N. mucosa* S1, *R. dentocariosa* S2, *S. sobrinus* A1 обладает высокой коагрегационной способностью (92,5%).

4. Минимальные бактерицидные концентрации Ag/PVP исследуемых штаммов вдвое превышают (*N. mucosa* S1 – 12,5 мкг/мл; *R. dentocariosa* S2 – 25 мкг/мл; *S. sobrinus* A1 – 50 мкг/мл; смешанная культура – 50 мкг/мл) значение минимальных ингибирующих концентраций.

5. Под воздействием наночастиц Ag/PVP на штаммы *N. mucosa* S1, *R. dentocariosa* S2, *S. sobrinus* A1 происходит снижение уровня образования биопленок. Минимальная концентрация, подавляющая образование биопленок совпадает с минимальной бактерицидной концентрацией для всех исследуемых штаммов.

6. При воздействии наночастиц Ag/PVP в бактерицидных концентрациях на зрелые биопленки, образованные штаммами *N. mucosa* S1, *R. dentocariosa* S2, *S. sobrinus* A1, а также совместной культурой происходит значительное снижение количества жизнеспособных бактерий.

7. Наночастицы Ag/PVP активизируют образование активных форм кислорода, чем вызывают окислительный стресс, приводящий к гибели клеток в совместной культуре *N. mucosa* S1, *R. dentocariosa* S2 и *S. sobrinus* A1.